

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Genetics and Microbiology

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Ph.D. study program: Molecular and Cellular biology, Genetics and Virology

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Modulace nádorového mikroprostředí a její vliv na imunoterapii nádorů

Tumor microenvironment modulation and the impact on cancer immunotherapy

Mgr. Jan Musil

Školitel/Supervisor: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

Praha, 2015

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	1
ABSTRAKT	3
ÚVOD	5
CÍLE PRÁCE	6
MATERIÁLY A METODY	6
VÝSLEDKY A DISKUZE	8
ZÁVĚR	13
ŽIVOTOPIS	25
VLASTNÍ PUBLIKACE	26
VLASTNÍ PODÍL	27
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	28

CONTENTS

SUMMARY	4
INTRODUCTION	15
OBJECTIVES OF THE STUDY	16
MATERIALS AND METHODS	16
RESULTS AND DISCUSSION	18
CONCLUSIONS	23
CURRICULUM VITAE	25
BIBLIOGRAPHY	26
REFERENCES	28

Seznam zkratek

ADAM	disintegrin a metaloproteináza
CAF	fibroblasty asociované s nádory
CD	diferenciační skupina
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
DC	dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
FSC	rozptyl světla v přímém směru
HIF-1 α	hypoxií indukovatelný faktor 1 α
IFN- γ	interferon γ
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
IGFBP-3	vazebný protein typu 3 pro inzulinu podobné růstové faktory
IGFBP-3R	receptor pro IGFBP-3
IGF-R	receptor pro IGF
IMV	intracelulární maturovaný virion
IP	intraperitoneální podání
IRF7	interferon regulující faktor 7
iTreg	indukované regulační T-lymfocyty
LgmnRGG.TT11	LgmnRGG do jehož sekvence byla vložena delší varianta pomocného epitopu p30
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MICA	protein A příbuzný MHC I. třídy
MICB	protein B příbuzný MHC I. třídy
MMP	matrixová metaloproteináza
MOI	multiplicita infekce
NK	přírozeně cytotoxické lymfocyty
NO	oxid dusnatý
nTreg	přírozené regulační T-lymfocyty
P13	VACV klon 13 kmene Praha
P13-H5-IGFBP-3	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen IGFBP-3 pod kontrolou H5 promotoru
P13-preS2S	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen pro povrchový anitgen viru HBV preS2S

P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3	P13-SigE7LAMP do jehož genu pro TK, byl vložen gen IGFBP-3 pod kontrolou E/L promotoru
P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3	P13 do jehož genu pro TK, byl vložen gen IGFBP-3 pod kontrolou E/L promotoru
P13-SigE7LAMP-TK	P13-SigE7LAMP jehož gen pro TK, byl přerušen vložením 100 bp odvozených od 11K promotoru VACV
PAMP	molekulární motiv asociovaný s patogeny
PC-1	proprotein konvertáza 1
PD-L1	ligand 1 pro PD1
PFU	plaky tvořící jednotky
PS	fosfatidylserin
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RGD motiv	motiv tvořený aminokyselinami argininem, glycinem, kyselinou asparagovou
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rVACV	rekombinantní virus vakcinie
SC	subkutánní podání
SigE7LAMP	fúzní protein tvořený signální sekvencí pro endoplazmatické retikulum, sekvencí E7 onkoproteinu HPV16 a sekvencí s lysozomy asociovaného membránového proteinu
TAM	makrofágy asociované s nádory
TCR	receptor T-lymfocytů
TGF- β	transformující růstový faktor β
T _H 1	pomocný T-lymfocyt typu 1
T _H 2	pomocný T-lymfocyt typu 2
TK	tymidin kináza
TLR-9	receptor 9 podobný proteinu Toll
TNF- α	faktor α nekrotizující nádory
Treg	regulační T-lymfocyt

Abstrakt

Modulace nádorového mikroprostředí představuje možnost, jak inhibovat růst nádorů a posílit protinádorovou imunitní odpověď. V předložené práci jsme použili pro modulaci nádorového mikroprostředí dvě strategie. Zaprvé, jsme zkonstruovali rVACV ko-exprimující tumor supresorový gen pro IGFBP-3 a gen kódující fúzní imunogen SigE7LAMP. Exprese IGFBP-3 byla řízena buď časným vakciniovým promotorem H5 nebo syntetickým časně/pozdním (E/L) promotorem. Zjistili jsme, že exprese IGFBP-3 řízená H5 promotorem vede k produkci většího množství proteinu než exprese řízená E/L promotorem. Imunizace myši rVACV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 inhibovala růst nádorů TC-1 efektivněji než imunizace kontrolním virem P13-SigE7LAMP-TK⁻. Zároveň indukovala také silnější odpověď T-lymfocytů proti VACV antigenům. Pozorovali jsme, že vysoká exprese IGFBP-3 vedla ke zvýšení míry replikace viru a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, což mělo za následek déletrvající antigenní stimulaci. Vysoká míra produkce IGFBP-3 rovněž korelovala s lepší adsorpcí viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňky CV-1 v porovnání s P13-SigE7LAMP-TK⁻. Identifikovali jsme dva rozdíly ve struktuře IMV mezi viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK⁻. IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 do své struktury inkorporovaly protein IGFBP-3 a navíc obsahovaly větší množství fosfatidylserinu ve své vnější membráně, což pravděpodobně způsobilo zvýšený příjem těchto IMV buňkami prostřednictvím makropinocytózy. Pro měření obsahu PS jsme použili průtokovou cytometrii, kdy jsme purifikované viriony VACV imobilizovali pomocí protilátek na mikrokuličkách.

Zadruhé, jsme zkonstruovali DNA vakcínu proti asparaginylové endopeptidáze legumain, která je ve vysoké míře exprimována M2 polarizovanými TAM. Pro zvýšení efektivity DNA imunizace proti legumainu, jsme navrhli několik modifikací jeho aminokyselinové sekvence. Tyto zahrnovaly mutagenезi RGD motivu, která vedla k inhibici maturace legumainu a změnu v buněčné lokalizaci. Dále jsme provedli inzerci pomocného epitopu p30 odvozeného od tetanového toxinu, který je schopný aktivovat pomocné CD4⁺ T-lymfocyty. Obě použité modifikace signifikantně posílily imunitní odpověď proti legumainu. Jejich kombinace ovšem další signifikantní zvýšení nepřinesla. DNA vakcinace indukuje T_H1 i T_H2 odpověď, z nichž pouze T_H1 podporuje indukci protinádorových CD8⁺ CTL. Pro posílení T_H1 a CTL odpovědi jsme použili adjuvans CpG-ODN nebo depleci Treg pomocí protilátky proti CD25. Podání CpG-ODN nemělo žádný efekt. Deplece Treg ovšem signifikantně posílila imunitní odpověď indukovanou konstruktem LgmnRGG.TT11. Imunizace za použití LgmnRGG.TT11 byla schopna signifikantně inhibovat růst nádorů, ale neovlivnila tvorbu plicních metastáz ani počet TAM.

Summary

Modulation of the tumor microenvironment represents a possible way to inhibit cancer growth and enhance anti-cancer immune responses. In the presented work we employ two strategies for tumor microenvironment modulation. Firstly, we have constructed rVACV co-expressing the tumor suppressor gene IGFBP-3 and the fusion gene encoding the immunogen SigE7LAMP. The expression of IGFBP-3 was controlled either by the early vaccinia virus H5 promoter or by the synthetic early/late (E/L) promoter. We have shown that expression of IGFBP-3 regulated by the H5 promoter yielded higher amounts of IGFBP-3 protein when compared with the E/L promoter. Immunization with P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 was more effective in inhibiting the growth of TC-1 tumors in mice and elicited a higher T-cell response against VACV-encoded antigens than the control virus P13-SigE7LAMP-TK⁻. We found that high-level production of IGFBP-3 enhanced virus replication both *in vitro* and *in vivo*, resulting in profound antigen stimulation. Production of IGFBP-3 was associated with a higher adsorption rate of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 to CV-1 cells when compared with P13-SigE7LAMP-TK⁻. We have identified two structural differences between the IMVs of the IGFBP-3 expressing virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 and P13-SigE7LAMP-TK⁻. The P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 IMVs incorporate the IGFBP-3 protein and they have elevated phosphatidylserine exposure on the outer membrane that could possibly result in increased uptake of these IMVs via macropinocytosis. The PS content of IMVs was measured by flow cytometry using microbeads covered with immobilized purified VACV virions.

Secondly, we have developed a DNA vaccine against the asparaginyl endopeptidase legumain that is overexpressed in M2-polarized TAM. To enhance the efficacy of DNA immunization against legumain, we performed several modifications of the legumain protein. These include mutagenesis of the RGD motif that resulted in diminished maturation and changed cellular localization of the legumain protein. Furthermore we inserted the p30 helper epitope from the tetanus toxin, which is capable to induce CD4⁺ helper T-cells. Both modifications significantly enhanced the immune response against legumain. There was no further significant enhancement of the anti-legumain response when RGD mutation and p30 insertion were combined. DNA vaccination induces both T_H1 and T_H2 responses, of which only T_H1 promotes the induction of anti-tumor CD8⁺ CTL. To enhance T_H1 and CTL responses we used CpG-ODN as adjuvant or depleted Treg using an antibody against CD25. Although administration of CpG-ODN showed no effect, the depletion of Treg significantly enhanced the immune response elicited by LgmnRGG.TT11. We were able to show that immunization using LgmnRGG.TT11 was capable to significantly inhibit tumor growth, but did not inhibit formation of pulmonary metastasis nor altered the amount of TAM.

1. Úvod

Solidní nádory představují organizované struktury podobné orgánům, tvořené různými komponentami, které zabezpečují růst nádorových buněk, a jejich únik před imunitním systémem. Nebuněčnou komponentou je ECM, která v nádorech prochází rozsáhlými změnami. Dochází k ukládání orientovaných kolagenových svazků, které podporují infiltraci nádorových buněk do okolních tkání. Nádorové prostředí je rovněž charakteristické zvýšenou degradací ECM prostřednictvím proteáz z rodin MMP a ADAM. Degradace umožňuje opět pronikat nádorovým buňkám do okolí, ale dále podporuje jejich růst uvolňováním růstových faktorů z ECM (Hynes 2009). Ovlivňuje rovněž charakter protinádorové imunitní odpovědi v důsledku uvolňování cytokinů z ECM, jako např. TGF- β (Hynes 2009). Proteolýza komponent ECM vede k tvorbě matrikinů, které mohou mít funkci chemokinů nebo mohou indukovat změny v produkci cytokinů buňkami imunitního systému (Adair-Kirk a Senior, 2008).

Buněčnou složku pak tvoří buňky imunitního systému a buňky mezenchymálního původu, jako např. CAF představující významné modulátory nádorového stromatu, které podporují angiogenezi, růst nádorů a proces EMT (Cirri a Chiarugi, 2012). Jsou zdrojem cytokinů, jako např. TGF- β , prostřednictvím kterého mohou podporovat diferenciaci Treg a inhibovat funkci NK buněk a CTL (Harper a Sainson, 2014). Nádory se vyvíjejí v blízkém kontaktu s imunitním systémem a můžeme se u nich setkat s infiltrací prakticky všemi druhy leukocytů. Mezi hlavní mediátory protinádorové imunitní odpovědi patří především NK buňky, T_H1 lymfocyty, CD8⁺ CTL a M1 polarizované makrofágy. NK buňky se podílejí na rané fázi protinádorové odpovědi, kdy odstraňují nádorové buňky exprimující ligandy pro jejich aktivační receptory, jako např. MICA, nebo postrádající expresi ligandů pro inhibiční receptory, např. při snížené expresi MHC (Schreiber et al., 2011). Infiltrující T_H1 lymfocyty produkcí IFN- γ a TNF- α indukují v nádorových buňkách senescenci (Braumuller et al., 2013). Pod vlivem IFN- γ dále dochází k diferenciaci M1 makrofágů, které produkují ROS a NO, pomocí nichž zabíjejí nádorové buňky (Tugal et al., 2013). Zbýlé dělí se nádorové buňky a buňky unikající z nádorových ložisek jsou dále zabíjeny CD8⁺ CTL (Eyles et al., 2010). V důsledku selekčního tlaku imunitního systému mohou vznikat únikové varianty nádorových buněk, které již imunitní systém nedokáže kontrolovat (Schreiber et al., 2011). V důsledku uvolňování autoantigenů může docházet k aktivaci nTreg, které následně inhibují protinádorové T_H1 a CD8⁺ CTL (Miyara et al., 2009). Nádorové prostředí je rovněž bohaté na TGF- β , který může indukovat diferenciaci imunosupresivních iTreg (Liu et al., 2007). Kromě toho TGF- β podporuje diferenciaci M2 makrofágů, které podporují vznik iTreg (Baay et al., 2011; Wang et al., 2011). Exprimují inhibiční ligandy jako např. PD1L, čímž inhibují CD8⁺ CTL (Noman et al., 2014). Makrofágy secernují rovněž růstové faktory podporující angiogenzi a růst nádorů. Sekrecí MMP podporují pronikání nádorových buněk do okolních tkání a jejich intravazaci do krevního řečiště (Chanmee et al., 2014; Wyckoff et al., 2007).

2. Cíle práce

Cíle předložené práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Zkonstruovat rVACV nesoucí ve svém genomu tumor supresorový gen IGFBP-3, pod kontrolou časného H5 či syntetického časně-pozdního E/L promotoru, a imunogen SigE7LAMP.
2. Charakterizovat připravené rVACV z hlediska exprese IGFBP-3, schopnosti indukovat protinádorovou imunitní odpověď a potlačit růst nádorů.
3. Pokusit se objasnit jaký mechanismus je zodpovědný za inhibici růstu nádorů.
4. Zavést postupy detekce M2 polarizovaných TAM exprimujících legumain.
5. Pomocí těchto metod charakterizovat nádorový model cervikálního karcinomu založený na buňkách MK16/ABC z hlediska obsahu TAM.
6. Připravit DNA vakcínu proti legumainu, v níž byla jeho sekvence modifikována pro zvýšení imunogennosti.
7. Stanovit zda navržené genové modifikace a popřípadě jejich kombinace zvyšují imunogennost a jsou schopné inhibovat růst nádorů.
8. Ověřit, zda imunita indukovaná připravenou DNA vakcínou ovlivňuje množství TAM v nádorech a je schopna omezit tvorbu plicních metastáz.

3. Materiály a metody

rVACV nesoucí gen IGFBP-3

Základem pro konstrukci rVACV nesoucích gen IGFBP-3 byl klon 13 vakciniového kmene Praha. Sekvenci IGFBP-3 jsme obdrželi od Dr. W. Zwerschkeho (Universita Innsbruck). Gen pro IGFBP-3 byl vložen do genu pro virovou TK v rekombinačním plazmidu pSC59-H5. Byly připraveny 2 varianty rekombinačního plazmidu lišící se promotorem řídícím expresi IGFBP-3, kterým byl buď syntetický časně-pozdní E/L promotor nebo časný H5 promotor. Pro přípravu a selekci rVACV byly použity standardní metody (Perkus et al., 1986). Správné rekombinanty byly identifikovány pomocí PCR. Pro analýzu exprese IGFBP-3 byla použita souprava Human IGFBP-3 DuoSet ELISA Development System.

In vivo pokusy s rVACV byly prováděny na samicích myšího kmene C57BL/6. Stanovení buněčné imunity bylo provedeno, metodou ELISPOT IFN- γ . Protinádorový účinek rVACV byl testován v profylaktickém a terapeutickém uspořádání. V profylaktickém uspořádání byly myšim po imunizaci SC injikovány buňky MK16/ABC. Terapeutická imunizace byla testována na myších,

kterým byly SC injikovány buňky TC-1 a následně byly imunizovány. Pro analýzu množení rVACV *in vivo* byla použita qPCR, kdy byla imunizovaným myším v indikovaných intervalech odebrána ovária, ze kterých byla izolována DNA pomocí Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit.

Množení rVACV *in vitro* bylo testováno na buňkách CV-1 nebo TC-1, které byly infikovány MOI 0,1. Množství infekčního viru v materiálu bylo stanoveno pomocí virové titrace. Vliv IGFBP-3 na replikaci rVACV byl studován pomocí neutralizující protilátky AF675. Penetrace rVACV do buněk byla analyzována neutralizačním testem za použití neutralizujícího králíčího séra. Míra adsorpce rVACV na buňky byla stanovena plakovou titrací jako množství neadsorbovaného viru v inokulu.

Pro strukturní analýzu byly použity suspenze IMV přečištěné přes sacharózový gradient se stejným obsahem proteinů. Tyto byly analyzovány buď metodou western-blot nebo pomocí průtokové cytometrie. V případě použití western-blotu byly IMV frakcionovány dle publikovaných postupů a přítomnost IGFBP-3 byla stanovena pomocí protilátky BAF675 (Gomez a Esteban, 2001; Zurkova et al., 2010). Při použití průtokové cytometrie byly IMV imobilizovány na mikrokuličkách s navázaným proteinem G a myším anti-VACV sérem. Přítomnost PS byla detekována pomocí Annexinu V konjugovaným s PE. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD LSRFortessa a data byla zpracována pomocí FlowJo 7.6.5.

Vakcína proti legumainu

Plazmidy pro imunizaci proti legumainu byly připraveny RNDr. Michalem Šmahelem. Sekvence pro legumain byla získána metodou RT-PCR z buněk TC-1 a vložena do plazmidu pBSC. Pro přípravu variant LgmnRGG a LgmnCGG bylo použito cílené mutagenese pomocí soupravy Altered Sites II Mammalian Mutagenesis System. Pro přípravu fúzního genu byl za sekvenci kódující legumain nebo jeho mutované varianty vložen epitop p30, a to buď ve zkrácené (TT1s) nebo dlouhé (TT1l) variantě.

Konstrukty byly následně použity pro imunizaci biolistickou metodou, kdy byla DNA navázána na zlaté partikule, které byly použity jako náplň pro náboje do genové pistole. Myši byly imunizovány celkem $3 \times$ v týdenních odstupech $2\mu\text{g}$ DNA. Části myší bylo v den imunizace IP podáno CpG ODN, další části myší byla 4 dny před imunizací IP injikována protilátka proti CD25. Týden po poslední imunizaci byla stanovena buněčná imunita metodou ELISPOT INF- γ , nebo byly myši SC injikovány buňky MK16/ABC.

Přítomnost makrofágů v nádorech byla stanovena imunohistochemickými metodami nebo pomocí průtokové cytometrie, kdy byla z nádorů připravena jednobuněčná suspenze pomocí disociátoru gentleMACS Octo. Makrofágy exprimující legumain byly detekovány na průtokovém cytometru pomocí protilátky anti-CD11b značené FITC, anti-F4/80 konjugované s APC-eFluor 780. Pro barvení legumainu byla použita králíčí polyklonální protilátka, popř. izotypová kontrola, následována sekundární monoklonální protilátkou anti-králíčí Ig značenou Alexa Fluor 546.

Pro analýzu ovlivnění tvorby plicních metastáz byly myším, jejichž nádory dosáhly velikosti 1 cm^3 vyjmuty plíce.

4. Výsledky a diskuze

Vliv exprese IGFBP-3 na protinádorovou imunoterapii

Naše prvotní hypotéza předpokládala, že by vysoká hladina exprese IGFBP-3 zajištěná rekombinantním virem vakcinie mohla zpomalit růst nádorů v našem modelu cervikálního karcinomu indukovaného E7 proteinem viru HPV16 a tak poskytnout čas pro indukci protinádorové imunitní odpovědi zacílené proti onkoproteinu E7. IGFBP-3 reguluje růst nádorových buněk na několika úrovních. Snižuje dostupnost IGF I a tak odebírat signály důležité pro přežití. Alternativně může navozovat apoptózu mechanismy nezávislými na vazbě IGF a to díky své internalizaci, transportu do jádra a interakci s jadernými partnery, nebo prostřednictvím IGFBP-3R (Yamada a Lee, 2009; Ingermann et al., 2010). Buňky transformované HPV mají díky E7 onkoproteinu schopnost snižovat množství IGFBP-3 v jádře zvýšenou polyubiquitinací a následnou degradací v proteazomu. Ačkoliv toto naznačuje, že použití našeho modelu není výhodné, je třeba počítat se schopností IGFBP-3 ovlivňovat buňky nádorového stromatu a také inhibiční dráhy nezávislé na jaderné lokalizaci. Bylo např. pozorováno, že inhibice signalizace z IGF-IR vede ke zvratu transformovaného fenotypu cervikálních nádorových buněk (Nakamura et al., 2000).

Za účelem testování naší hypotézy jsme zkonstruovali rVACV nesoucí gen pro IGFBP-3 pod kontrolou časného promotoru H5 nebo syntetického pozdně-časného promotoru E/L, a zároveň gen pro fúzní protein SigE7LAMP, který umožňuje indukci robustní imunitní odpovědi proti E7 onkoproteinu.

Během charakterizace rVACV jsme odhalili několik rozdílů mezi viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a kontrolním virem P13-SigE7LAMP-TK⁻. Zjistili jsme, že infekce buněk CV-1 virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 vede k vyšší produkci IGFBP-3 než infekce virem P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. Pozorování na jiných rVACV, ukazovala spíše vyšší expresi genů pod kontrolou E/L promotoru (Nemeckova et al., 2003). Vysoká exprese proteinu pod kontrolou E/L promotoru může ovšem interferovat s tvorbou infekčních virových partikulí (Zurkova et al., 2011). Rekombinantní viry, u kterých by pod kontrolou E/L promotoru docházelo k vysoké hladině exprese IGFBP-3, by tak nemusely vznikat a to ze dvou důvodů. IGFBP-3 by mohlo interferovat se sestavením virové partikule, což přicházelo v úvahu, neboť jsme pozorovali, že dochází k jeho inkorporaci do IMV. Alternativně, by mohlo v důsledku vysoké hladiny IGFBP-3 docházet k indukci apoptózy, která v případě kmene Praha není zcela inhibovaná antiapoptotickými mechanismy jako např. u kmene WR (Liskova et al., 2011).

Dále jsme testovali profylaktický a terapeutický účinek rVACV *in vivo* na modelu cervikálního karcinomu. Pro preventivní imunizaci jsme použili buňky MK16/ABC, které mají sníženou expresi MHC molekul I. třídy a jsou, tudíž odolnější proti eliminaci CD8⁺ CTL než TC-1 buňky. Opět jsme pozorovali rozdíly mezi jednotlivými rVACV. Velikost nádorů u myši imunizovaných virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 byla signifikantně menší než u myši imunizovaných virem P13-PreS2S a

P13-H5-IGFBP-3. Podobně i u terapeutické imunizace měly myši léčené virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 signifikantně menší nádory než myši, kterým byl injikován kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK⁻. Pozorovaný terapeutický efekt si vysvětlujeme lepším množením viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, jelikož jsme při testování replikace rVACV *in vivo* pomocí qPCR pozorovali vyšší množení viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 oproti ostatním virům, které ovšem v důsledku vysoké variability nebylo signifikantní. Pro potvrzení jsme tedy přistoupili k testování množení rVACV *in vitro* na buněčných liniích CV-1 a TC-1. Pokusy *in vitro* potvrdily, že se virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 množí signifikantně lépe než ostatní rVACV bez ohledu na použitou buněčnou linii. Lepší množení jsme pozorovali i u viru P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3, ale pouze při použití CV-1 buněk. Alternativní hypotézy, zahrnující protinádorové působení samotného IGFBP-3 či silnější indukci protinádorové imunitní odpovědi se nepodařilo prokázat.

Abychom zjistili, zda je lepší množení viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 způsobeno vysokou hladinou IGFBP-3, rozhodli jsme se použít neutralizující protilátku proti IGFBP-3. Pozorovali jsme, že i částečná neutralizace IGFBP-3 signifikantně snižuje replikaci viru.

Bylo pozorováno, že u rVACV může docházet k inkorporaci rekombinantních proteinů do různých částí virové partikule (Gomez a Esteban, 2001; Zurkova et al., 2010). Pro stanovení zda je tomu tak také u IGFBP-3, jsme přes sacharózový gradient purifikovali IMV virů P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK⁻ a jejich nezávisle připravených sesterských virů. Použití sesterských virů bylo nutné pro vyloučení vlivu náhodných mutací. Analýza za použití western-blotu odhalila přítomnost IGFBP-3 v případě IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Slabý signál jsme detekovali také v IMV P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3, což naznačuje menší množství integrovaného proteinu. Žádný signál jsme nedetekovali u viru P13-SigE7LAMP-TK⁻. IGFBP-3 a bylo detekované ve všech frakcích viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Jistou výjimku představuje membránová frakce, kde byl IGFBP-3 detekován, ale pouze v nepatrném množství. Pro zjištění zda inkorporace IGFBP-3 ovlivňuje proteinové složení IMV, jsme tyto separovali na SDS-PAGE a gel následně obarvili Coomassie blue. Nedetekovali jsme žádné rozdíly mezi viry exprimujícími IGFBP-3 a virem P13-SigE7LAMP-TK⁻.

Dále jsme přistoupili k analýze replikačního cyklu rVACV, abychom zjistili, která z jeho fází je ovlivněna IGFBP-3. Jako první jsme testovali možnost, že v důsledku integrace IGFBP-3 či jiné strukturální změny dochází k lepší adsorpci viru na buňky nebo lepší penetraci do buňky.

IGFBP-3 by mohl adsorpci a penetraci viru podporovat díky své C-koncové části, která obsahuje vazebné domény pro různé komponenty ECM a pro kaveolin-1 (Yamada a Lee, 2009). Navíc bylo pozorováno, že peptidy odvozené od domény IGFBP-3 schopné vázat heparin mohou sloužit jako nosiče pro transport proteinů do buněk (Goda et al., 2008). Pro testování hypotézy, že IGFBP-3 pomáhá penetraci či adsorpci viru na buňky, jsme použili dva nezávislé testy. V penetračním testu jsme v daném časovém intervalu zastavili vstup viru do buňky pomocí neutralizujících protilátek proti VACV a následně sledovali rozdíly v počtu vzniklých plaků. Tento test ovšem neumožňuje odlišit, zda

pozorované rozdíly nejsou dané lepší adsorpcí viru na buňky. Přistoupili jsme tedy ke stanovení míry adsorpce na základě množství neadsorbovaného viru v inokulu. Oba tyto testy v souladu s hypotézou, že IGFBP-3 podporuje adsorpci rVACV, ukázaly, že virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 adsorbuje na buňky lépe než kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK⁻. Ačkoliv tedy tyto výsledky naznačují, že IGFBP-3 nesený IMV by mohl interagovat s ECM nebo buněčnými proteiny a tak podporovat lepší adsorpci viru, proti této hypotéze hovoří výsledky strukturní analýzy IMV. Je pravděpodobné, že v takovém případě by musel být IGFBP-3 detekovatelný v membránové frakci IMV, kde se ho podařilo detekovat pouze nepatrné množství.

Pro objasnění lepší adsorpce P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňky jsme přistoupili k analýze obsahu PS v IMV. K tomuto kroku nás vedla pozorování, která ukazují, že VACV pro vstup do buněk používá makropinocytózu a molekulární mimikry, kdy se díky PS ve své membráně tváří jako apoptotické tělísko (Mercer a Helenius, 2010). Bylo ovšem pozorováno, že různé kmeny VACV indukují různé formy makropinocytózy. Pro analýzu obsahu PS jsme přistoupili k použití metod průtokové virometrie, které využívají napojení virionů na různé nanočástice či mikročástice, barvení virionů pomocí fluorescenčně značených protilátek a následné měření pomocí průtokového cytometru. Při stanování obsahu PS ve virionech rVACV jsme vycházeli především z práce zabývající se detekcí a kvantifikací HIV pomocí magnetických částic pokrytých protilátkami proti GP120 a následným barvením virionů pomocí fluorescenčních nanočástic (Kim et al., 2009). V našem testu jsme imobilizovali purifikované IMV na mikrokuličkách pokrytých proteinem G a s navázanými protilátkami proti VACV. Výhodou tohoto přístupu je možnost použití FSC a SSC pro identifikaci komplexů mikrokuliček s virem. Ačkoliv se u VACV jedná o velký DNA virus je, z hlediska světelného rozptylu, svou velikostí kolem 300 nm na hraně detekovatelnosti běžného průtokového cytometru jako např. BD LSRFortessa (Headland et al., 2014). K určení obsahu PS na navázaných virionech jsme následně použili Annexin V značený PE. Za pomoci této metody jsme zjistili, že virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 ve své membráně obsahuje více PS než P13-SigE7LAMP-TK⁻. Domníváme se tedy, že morfogeneze IMV v buňkách obsahujících vysoké množství pro-apoptotického proteinu IGFBP-3 vede ke vzniku virionů se zvýšeným obsahem PS. Tyto viriony jsou efektivněji macropinocytovány, což ve výsledku zlepšuje efektivitu infekce a způsobuje lepší množení viru. Virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 by se tak *in vivo* mohl déle udržet v hostiteli, což by vedlo k déle trvající stimulaci protinádorové imunitní odpovědi a zpomalilo růst nádorů.

Imunizace proti M2 polarizovaným TAM

Před započítím testování DNA vakcíny proti legumainu bylo nutné ověřit, zda nádory vyvolané buňkami MK16 obsahují TAM a zda tyto exprimují legumain. Jako první jsme pro určení použili imunohistochemické metody, které ukázaly, že nádory obsahují makrofágy a buňky exprimující legumain. Histologie ovšem nebyla schopna zjistit, zda se u buněk exprimujících legumain jedná o makrofágy. Pro přesnější určení jsme se rozhodli použít průtokové cytometrie. Navrhli jsme tedy

panel, ve kterém byly makrofágy definovány jako buňky exprimující F4/80 a MHC II. třídy. Testování ovšem ukázalo, že tento panel je nevhodný, jelikož nedokáže jasně vyčlenit skupinu TAM, ačkoliv je schopný detekovat např. peritoneální makrofágy. To je dáno zřejmě tím, že M2 polarizované TAM mohou mít sníženou expresi MHC II (Wang et al., 2011).

Rozhodli jsme se tedy TAM definovat jako buňky exprimující CD11b a F4/80. Tímto způsobem se nám podařilo jasně definovat populaci TAM, ve které jsme stanovovali expresi legumainu. Zjistili jsme, že 48% TAM v nádorech MK16/ABC exprimuje legumain.

Následně jsme přistoupili k přípravě DNA vakcíny. Pro zvýšení imunogennosti legumainu jsme se rozhodli provést genové modifikace. Jako první, jsme se rozhodli provést mutagenезi vazebného RGD motivu. Vycházeli jsme při tom z práce, při které mutace v RGD motivu PC-1 vedla ke změně lokalizace a snížení stability (Lusson et al., 1997). Předpokládali jsme, že snížením stability a změny lokalizace by mohlo vést ke zvýšené tvorbě antigenních peptidů. V souladu s touto hypotézou jsme pozorovali, že mutované legumainové proteiny mají inhibovanou maturaci a pozměněnou lokalizaci v buňce, což bylo spojeno se zhruba trojnásobným zvýšením imunogennosti oproti nemutovanému proteinu. Podobné zvýšení imunogennosti bylo pozorovatelné i v případě, kdy byl do sekvence pro legumain vložen pomocný epitop p30 odvozený od tetanového toxinu, schopný se vázat na MHC II. třídy a tak aktivovat pomocné CD4⁺ T-lymfocyty. Kombinace obou modifikací již další zlepšení nepřinesla. Předpokládáme, že to může být způsobeno srovnatelným efektem vložení epitopu p30 na maturaci a buněčnou lokalizaci.

DNA vakcinace pomocí biolistické metody vede k indukci T_H1 i T_H2 imunity (Dean et al., 2003). I my jsme pozorovali, že proti pomocnému epitopu p30 použitému v DNA vakcínách proti legumainu odpovídají jak T_H1, tak T_H2 lymfocyty. Cytokiny produkované T_H2 lymfocyty podporují protilátkovou odpověď a mohou vést k diferenciaci supresorových M2 polarizovaných makrofágů (Baay et al., 2011). Naopak T_H1 lymfocyty jsou důležitou součástí protinádorové imunity. Jsou důležité pro proces licencování, při kterém aktivují DC, z nichž se stávají lepší stimulatory protinádorových CD8⁺ CTL. Navíc T_H1 lymfocyty podporují infiltraci CTL do nádorů a chrání je před funkčním vyčerpáním (Bos a Sherman, 2010; Aubert et al., 2011).

Pro posílení indukce T_H1 odpovědi jsme se rozhodli zkombinovat imunizaci pomocí genové pistole s IP podáním CpG-ODN, které funguje jako adjuvans posilující T_H1 odpověď. Výsledky publikované naší laboratoří ukázaly, že systémové podání CpG motivů může posílit protinádorový efekt DNA imunizace pomocí genové pistole (Smahel et al., 2011). Z molekulárního hlediska nemetylované CpG motivy mimikují bakteriální DNA, která představuje PAMP. Nemetylovaná DNA je rozpoznávána TLR-9 exprimovaným na pDC, který v nich prostřednictvím IRF7 indukuje produkci IFN I. třídy (Kumagai et al., 2008). Nepodařilo se nám prokázat, že by podání CpG posílilo indukci T_H1 odpovědi proti legumainu. Zároveň jsme nepozorovali žádný efekt na indukci CD8⁺ T-lymfocytů.

Indukce imunitní odpovědi proti tělu vlastním antigenům může být inhibována Treg. Bylo popsáno, že jejich deplece protilátkou proti CD25 může posílit aktivaci CD8⁺ CTL (Chuang et al.,

2009). V souladu s tímto pozorováním deplece Treg před imunizací signifikantně zvýšila imunitní odpověď proti legumainu při imunizaci konstruktem LgmnRGG.TT11.

Následně jsme přistoupili k ověření, zda imunizace konstruktem LgmnRGG.TT11 dokáže sama nebo v kombinaci s deplecí Treg inhibovat růst nádorů. Zjistili jsme, že imunizace proti legumainu signifikantně inhibuje růst nádorů a to stejně dobře jako samotná deplece Treg. Kombinace deplece Treg a imunizace proti legumainu další zlepšení nepřinesla a velikost nádorů v této skupině myši byla nepatrně větší než u myši, které byly jen imunizovány LgmnRGG.TT11. Ačkoliv je CD25 konstitutivně exprimováno na povrchu Treg, dochází k jeho indukci i na aktivovaných efektorových T-lymfocytech (Seddiki et al., 2006). Při podání anti-CD25 protilátky, tak může rovněž docházet k eliminaci časně aktivovaných efektorových T-lymfocytů.

Dále jsme analyzovali, zda je inhibice růstu nádorů spojena se snížením počtu legumain⁺ TAM. Nepodařilo se nám prokázat, že by imunizace LgmnRGG.TT11 snižovala množství legumain⁺ TAM. Pro analýzu průtokovou cytometrií jsme vybírali vždy nádory, které byly v nejdelším rozměru velké min. 1 cm. Je možné, že u takto velkých nádorů dochází k akumulaci legumain⁺ TAM hlavně v hypoxických oblastech. Tento předpoklad je založen na pozorováních, která ukazují, že TAM preferenčně infiltrují hypoxické oblasti nádorů (Chanmee et al., 2014). Navíc bylo pozorováno, že ke zvýšené expresi legumainu dochází za hypoxických podmínek (Chen et al., 2015). T-lymfocyty reagují na hypoxii zvýšením exprese HIF-1 α , který negativně reguluje signální transdukci z TCR a snižuje expresi pro-zánětlivých cytokinů (Kumar a Gabrilovich, 2014). Hypoxie navíc podporuje aktivitu CD39 a CD73, což vede k akumulaci imunosupresivního adenosinu (Kumar a Gabrilovich, 2014). Hypoxické podmínky mohou dále podporovat expresi koinhibiční molekuly PD-1L na TAM, což může vést k inhibici CD8⁺ CTL (Noman et al., 2014). Předpokládáme tedy, že by k eliminaci legumain⁺ TAM mohlo docházet v raných fázích, kdy jsou nádory ještě malé a CD8⁺ CTL mají lepší přístup k TAM. Díky odstraňování TAM by tak nádory byly ve svém růstu znevýhodněny. Nedá se ovšem vyloučit možnost, že legumain v nádorech exprimují i jiné buňky, jako např. samotné nádorové buňky MK16/ABC. Nicméně analýza MK16/ABC pomocí western-blotu exprese legumainu neprokázala (data nejsou ukázána). K jeho indukci by ovšem mohlo dojít *in vivo* pod vlivem hypoxie, což ovšem neukazují histologické řezy.

Nepodařilo se nám rovněž prokázat, že by imunizace proti legumainu snižovala tvorbu plicních metastáz. Vývoj plicních metastáz u nádorů vyvolaných MK16/ABC koreluje s vývojem primárního nádoru (Mikyskova et al., 2000). Analyzovali jsme tedy myši, jejichž nádory dosáhly velikosti 1 cm³. Je možné, že je při této velikosti nádorů imunitní systém již vyčerpaný a nedokáže tvorbu metastáz zabránit.

5. Závěr

Testovali jsme dvě strategie modulace nádorového prostředí. První spočívala v konstrukci rekombinantních virů vakcinie nesoucích tumor supresorový gen IGFBP-3 a imunogen SigE7Lamp. Zjistili jsme, že nejvyšší exprese IGFBP-3 je dosaženo, pokud se gen nachází pod kontrolou časného promotoru H5. Pozorovali jsme, že vysoká hladina exprese IGFBP-3 korelovala s inhibicí růstu nádorů u myši imunizovaných virem P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. Na druhé straně jsme ukázali, že samotná exprese IGFBP-3 růst nádorů neovlivňuje. Ve snaze objasnit mechanismus pozorovaného inhibičního efektu, jsme zjistili, že se virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 množí signifikantně lépe než kontrolní virus P13-SigE7LAMP-TK⁻ a jeho lepší množení souvisí s vysokou hladinou exprese IGFBP-3. Strukturní analýza viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 odhalila několik odlišností od viru P13-SigE7LAMP-TK⁻. Zprv jsme zjistili, že v důsledku vysoké hladiny exprese IGFBP-3 dochází k jeho inkorporaci do IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, a že toto koreluje s lepší adsorpcí viru na buňky. Zadruhé, jsme pomocí průtokové cytometrie pozorovali, že vysoká hladina exprese pro-apoptotického IGFBP-3 způsobuje zvýšení množství PS v membráně IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 oproti P13-SigE7LAMP-TK⁻. Na základě těchto výsledků jsme navrhli hypotézu, v níž předpokládáme, že vysoká hladina IGFBP-3 vede k jeho inkorporaci do IMV a zvyšuje v nich množství PS. Tyto IMV mohou následně efektivněji infikovat buňky v důsledku efektivnější indukce makropinocytózy. Efektivnější infekce pak umožňuje rVACV déle perzistovat v hostiteli, což je spojeno s delší stimulací imunitní odpovědi, která následně dokáže inhibovat růst nádorů. Naše pozorování tedy naznačují, že je možné měnit obsah PS v IMV VACV a tak ovlivňovat množení rekombinantních virů.

Druhá strategie spočívala v konstrukci DNA vakcíny proti M2 polarizovaným TAM, které se vyznačují zvýšenou expresí endopeptidázy legumain. V první fázi jsme charakterizovali model cervikálního karcinomu založený na buňkách MK16/ABC z hlediska přítomnosti legumain⁺ TAM. Za použití imunohistochemie a průtokové cytometrie jsme zjistili, že nádory vyvolané buňkami MK16/ABC obsahují TAM, a že 48% z nich exprimuje legumain. Následně jsme přistoupili k přípravě DNA vakcíny, ve které jsme pro zvýšení imunogennosti legumainu navrhli dvě genové modifikace a to mutaci v sekvenci RGD a vložení pomocného epitopu p30. Ukázali jsme, že obě modifikace ovlivňují maturaci genu pro legumain a jeho buněčnou lokalizaci, což je spojeno se zvýšenou indukcí imunitní odpovědi proti legumainu. Zjistili jsme, že další kombinace mutagenese RGG a vložení epitopu p30 již k dalšímu zvýšení imunitní odpovědi nevede. Jelikož DNA vakcinace biolistickou metodou indukuje také T_H2 odpověď, rozhodli jsme se posílit indukci T_H1 a CD8⁺CTL odpovědi pomocí podání CpG nebo deplecí Treg. Zjistili jsme, že zatímco podání CpG již k dalšímu zvýšení CTL odpovědi nevede, deplece Treg signifikantně posílila indukci imunitní odpovědi konstruktem LgmnRGG.TT11. Imunitní odpověď indukovaná LgmnRGG.TT11 signifikantně potlačovala růst nádorů MK16/ABC a to stejně dobře jako samotná deplece Treg. Kombinace deplece Treg a následná

imunizace LgmnRGG.TT11 již další zlepšení nepřinesla. Sledovali jsme, zda imunizace proti legumainu sníží množství legumain⁺ TAM v nádorech a bude schopna inhibovat tvorbu metastáz. Nepodařilo se nám prokázat, že by imunizace DNA vakcínou LgmnRGG.TT11 snížila množství legumain⁺ TAM v nádorech nebo byla schopna potlačit tvorbu plicních metastáz. Domníváme se, že imunizace proti legumainu inhibuje růst nádorů v raných fázích vývoje. Větší nádory se již kontrole imunitního systému vymykají, což umožňuje tvorbu plicních metastáz. Legumain⁺ TAM se pak mohou ve větších nádorech akumulovat v hypoxických oblastech, kde nejsou přístupny k cytolyze CD8⁺ CTL.

1. Introduction

Solid tumors are organized structures similar to organs. They are built by different components that interact with each other to ensure the growth of cancer cells and tumor immune escape. One of the non-cellular components of the tumor microenvironment is the ECM, which undergoes substantial changes during tumor development. Elevated deposition of oriented cross-linked collagens that enhance cancer cell invasion into surrounding tissue has been observed. Another hallmark of the tumor microenvironment is the enhanced degradation of ECM components by MMP and ADAM family proteases. The degradation of the ECM allows cancer cells to invade surrounding tissue and helps cancer cell growth by liberating growth factors sequestered in the ECM, e.g. TGF- β (Hynes 2009). Proteolysis of ECM components leads to generation of matrikines that can act as chemokines or can change expression of genes for cytokines in leukocytes (Adair-Kirk a Senior, 2008).

The cellular component of the tumor microenvironment is represented by cells of the immune system and cells of mesenchymal origin e.g. CAFs. CAFs are mayor modulators of the tumor stroma as they support tumor growth, angiogenesis and the process of EMT (Cirri a Chiarugi, 2012). They are also an important source of cytokines such as TGF- β , which supports the differentiation of Treg and inhibits the function of NK cells and CTLs (Harper a Sainson, 2014). Tumors develop in close contact with the immune system and so infiltration of nearly all types of leukocytes can be observed. NK cells, T_H1 lymphocytes, CD8⁺ CTLs and M1 polarized macrophages represent the most important leukocyte populations driving the antitumor immunity. During the early stage of the antitumor immune response NK cells destroy cancer cell expressing ligands for their activating receptors e.g. MICA and/or lacking expression of inhibitory ligands e.g. MHC (Schreiber et al., 2011). In later stages, infiltrating T_H1 lymphocytes secrete IFN- γ and TNF- α that induce cellular senescence in cancer cells (Braumuller et al., 2013). Furthermore IFN- γ drives M1 polarization in macrophages. These produce ROS and NO that induce apoptosis in cancer cells (Tugal et al., 2013). The remaining dividing cancer cells or cell escaping the tumor lesions are eliminated by CD8⁺ CTLs (Eyles et al., 2010). As the immune system exerts selective pressure, escape variants of cancer cells can develop, that are no longer controlled by the immune system. The release of autoantigens from dying cancer cells can lead to activation of nTregs, which inhibit T_H1 cells and CD8⁺ CTLs (Miyara et al., 2009). Furthermore high levels of TGF- β in the tumor microenvironment can induce the differentiation of immunosuppressive iTregs and M2 polarized macrophages, which can in turn promote further development of iTregs (Wang et al., 2011; Baay et al., 2011). M2 macrophages can also suppress CD8⁺ CTLs by expressing inhibitory ligands e.g. PD-1L (Noman et al., 2014). They secrete growth factors supporting angiogenesis and tumor growth. By secreting MMPs M2 macrophages help cancer cell invasion of surrounding tissue and their intravasation into the blood stream (Chanmee et al., 2014; Wyckoff et al., 2007).

2. Objectives of the study

The objectives of the presented study can be summarized into flowing points:

1. Construction of rVACV carrying the tumor suppressor gene IGFBP-3 in its genome under the control of either the early H5 promoter or the synthetic E/L promoter, together with the immunogen SigE7LAMP.
2. Characterization of the prepared rVACV, i.e. IGFBP-3 expression, induction of antitumor immunity and capability to suppress tumor growth.
3. Characterize the tumor suppressive mechanism
4. Introduce and optimize methods for detection of M2 polarized legumain expressing TAM
5. By using these methods characterize the TAM infiltration in the MK16/ABC cervical cancer model
6. Modify the sequence for legumain to enhance its immunogenicity and use this modified sequence as a DNA vaccine
7. Determine if the gene modifications or their combinations enhance immunogenicity of the DNA vaccine and if the vaccine efficiently suppresses tumor growth
8. Determine if the induced immune response affects the amount of TAMs in the tumors and limits the formation of lung metastases.

3. Materials and methods

rVACV carrying IGFBP-3

All rVACVs described below are based on the clone 13 of the vaccinia virus strain Prague. We obtained the sequence for IGFBP-3 by the courtesy of Dr. W. Zwerschke (University of Innsbruck). The gene for IGFBP-3 was inserted into the gene for the viral TK in the recombination plasmid pSC59-H5. Two variants of the recombination plasmid that differ in the promoter used to control expression of the IGFBP-3 gene (either H5 or E/L promoter) were prepared. Standard procedures were used for preparation and selection of the rVACV (Perkus et al., 1986). The rVACV were identified using PCR. Expression of IGFBP-3 by the rVACV was analyzed by using the Human IGFBP-3 DuoSet ELISA Development System.

In vivo experiments using rVACV were performed on female mice of the C57BL/6 strain. Induction of cellular immunity was measured by ELISPOT IFN- γ . The antitumor effect of rVACV was tested in prophylactic and therapeutic settings. In the prophylactic setting mice were immunized first with rVACV and subsequently challenged SC with MK16/ABC cells. Therapeutic immunization was tested on mice which were injected with TC-1 cells and subsequently immunized with rVACV.

In vivo replication of the rVACV was assessed by qPCR. DNA for qPCR was extracted from ovaria of immunized mice using Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit.

Virus replication *in vitro* was tested on CV-1 and TC-1 cell that were infected with MOI 0.1. The amount of infectious virus in the samples was determined by plaque assay. The effect of IGFBP-3 on virus replication was tested using the neutralizing antibody AF675. Penetration of rVACV into the cells was analyzed by a neutralization assay using an anti-VACV neutralizing rabbit serum. Cell adsorption was measured as amount of unadsorbed infectious particles in the inoculum using the plaque assay.

Sucrose purified suspensions of IMVs containing equal amounts of protein were used for structural analysis. Structural analysis was performed either using western-blot or flow cytometry. For western-blot analysis IMVs were fractionized using published methods and the presence of IGFBP-3 was detected using the biotinylated antibody BAF675 (Gomez a Esteban, 2001; Zurkova et al., 2010). Flow cytometry analysis was carried out with IMV immobilized on G-protein coated microbeads with bound anti-VACV serum. On immobilized IMVs PS was detected using PE stained Annexin V. Samples were measured on BD LSRFortessa and the obtained data were analysed in FlowJo 7.6.5.

DNA vaccine against legumain

The plasmids for immunization were constructed by RNDr. Michal Šmahel. The gene for legumain was amplified by RT-PCR from TC-1 cells and inserted into the pBSC vector. The Altered Sites II Mammalian Mutagenesis System was used for site-directed mutagenesis to prepare the gene variants LgmnRGG and LgmnCGG. The p30 helper epitope - either long (TT11) or short (TT1s) form - was inserted into the legumain gene or its mutated variants and they represent fusion gene constructs. The prepared DNA constructs were subsequently bound to gold particles and used as ammunition for immunization using a gene gun. Mice were immunized with 2 µg of DNA 3 times in weekly intervals. One group of mice was injected IP with CpG ODN on the day of immunization. Another group received IP an anti-CD25 antibody 4 days prior to immunization. One week after immunization cell immunity was measured using ELISPOT IFN-γ or mice were SC challenged with MK16/ABC cells.

Macrophage infiltration in tumors was detected using immunohistochemistry or by flow cytometry. For flow cytometry single cell suspension was prepared using the gentleMACS Octo dissociator. Macrophages were detected using an anti-CD11b antibody conjugated with FITC and anti-F4/80 conjugated with APC-eFluor780. Legumain was detected by a rabbit polyclonal antibody or isotype control and subsequent staining with an anti-rabbit antibody stained with AlexaFluor 546.

Lungs of mice whose tumor reached the size 1 cm³ were used to count metastasis.

4. Results and discussion

Effect of IGFBP-3 expression on tumor growth

Our original hypothesis was that high-level expression of IGFBP-3 by rVACV could inhibit the growth of tumors in our HPV16 E7 induced cervical cancer model, which would give time to the anti-E7 immune response to develop. IGFBP-3 can regulate growth of cancer cells by multiple mechanisms. It sequesters IGF I and thereby reduces pro-survival signaling in cancer cells. Alternatively IGFBP-3 can induce apoptosis in cancer cells by mechanisms independent of IGF I binding. For example IGFBP-3 can be internalized, transported to the nucleus and interact with nuclear proteins or it can induce apoptosis by binding to the IGFBP-3R (Yamada and Lee, 2009; Ingemann et al., 2010). HPV transformed cell can lower the amount of IGFBP-3 in the nucleus by E7 mediated enhanced polyubiquitination of IGFBP-3 and its subsequent degradation in the proteasome. Although the latter could indicate that our cervical cancer model is potentially unsuitable, it has to be taken into account that IGFBP-3 can still influence cells of the tumor microenvironment and/or use inhibitory pathways independent of nuclear localization. For example, it has been observed that inhibition of IGF-R signaling reverses the transformed phenotype of cervical cancer cells (Nakamura et al., 2000).

To test our hypothesis we constructed rVACVs co-expressing the IGFBP-3 gene under the control of the early H5 promoter or the synthetic early-late E/L promoter and the fusion protein SigE7LAMP, which induces robust immune responses against the E7 oncoprotein.

During rVACV characterization we observed several differences between the P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 virus and the control virus P13-SigE7LAMP-TK. We observed that IGFBP-3 expression is higher in CV-1 cells infected with P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 than P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. The expression under the E/L promoter is usually very strong as has been observed in other rVACVs constructed in our laboratory (Nemeckova et al., 2003). On the other hand, high level protein expression under the E/L promoter can interfere with formation of infectious virus (Zurkova et al., 2011). Recombinant VACVs expressing high amounts of IGFBP-3 under the control of the E/L promoter might not arise as we observed that IGFBP-3 is truly incorporated into the IMV. Alternatively, high-levels of the pro-apoptotic protein IGFBP-3 could induce apoptosis in infected cells, which in the case of the Prague strain is not fully inhibited by viral inhibitory mechanisms as in other strains e.g. WR (Liskova et al., 2011).

The anti-tumor effect of rVACV administration was tested in the setting of prophylactic and therapeutic immunization on our cervical carcinoma model. In the case of prophylactic immunization, mice were injected with MK16/ABC cell that have a lower expression of MHC I and are therefore more resistant to elimination by CD8⁺ CTL than TC-1 cells. Again, we observed noteworthy differences between rVACVs. Mice immunized with P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 developed significantly smaller tumors than mice immunized with P13-PreS2S and P13-H5-IGFBP-3. Similarly in

the therapeutic setting, mice treated with P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 exhibited significantly smaller tumors than mice treated with the control virus P13-SigE7LAMP-TK⁻. The observed therapeutic effect can be explained by enhanced *in vivo* replication of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 as was detected by qPCR. The differences in replication among rVACVs were not statistically significant due to high variability. To confirm the observed behavior of the rVACVs, we decided to test virus replication *in vitro* on CV-1 and TC-1 cell lines. Indeed we confirmed enhanced replication of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 compared to the other rVACVs regardless the cell line used. Higher replication compared to the control virus was also observed for P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 but only on CV-1 cells. Our data could not confirm any of the alternate hypotheses including the possibility of anti-tumor properties of IGFBP-3 alone or enhancement of anti-tumor immune response by IGFBP-3.

To test if IGFBP-3 itself enhances replication of the P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 virus we used a neutralizing antibody against IGFBP-3. We observed that even a partial neutralization of IGFBP-3 significantly reduced replication of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3.

It was observed that recombinant proteins can be incorporated into the virus particles of rVACV (Gomez a Esteban, 2001; Zurkova et al., 2010). To determine if it the above is true for IGFBP-3 we used sucrose purified IMVs of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3, P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3 and P13-SigE7LAMP-TK⁻ and their independently prepared sister viruses for analysis by western-blot. The inclusion of the sister viruses was necessary to exclude the effect of casual mutations. Western-blot detected the presence of IGFBP-3 in the IMVs of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 and a weaker signal suggesting lower protein amounts was detected in IMVs of P13-SigE7LAMP-E/L-IGFBP-3. No signal was detected in the IMVs of P13-SigE7LAMP-TK⁻. Furthermore, IGFBP-3 was detected in all fractions of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 with the exception of the viral membrane, where only trace amounts were detected. To investigate if IGFBP-3 incorporation disturbs the protein composition of IMVs, we separated IMVs of the rVACVs using SDS-PAGE and subsequently used Coomassie blue staining. We did not observe any differences in IMV composition of the IGFBP-3 expressing viruses and control P13-SigE7LAMP-TK⁻.

In the next step we wanted to learn which phase of the viral replication cycle was affected by IGFBP-3 expression. Firstly, we tested the hypothesis that IGFBP-3 incorporation or another structural difference could enhance virus adsorption or penetration into cells. IGFBP-3 could potentially enhance virus adsorption or penetration by interactions of its C-terminal domain with components of the ECM or with caveolin-1 (Yamada a Lee, 2009). Furthermore, it was observed that peptides derived from the heparin binding domain could be used as protein carriers to deliver exogenous proteins into cells (Goda et al., 2008). To test this hypothesis we used two independent assays. In the penetration assay we stopped virus penetration into the cells by a neutralizing anti-VACV antibody and determined the differences in formed virus plaques. This assay however could not determine if the observed differences are not caused by better adsorption onto cells. Therefore we

used an adsorption assay that measured the amount of unadsorbed virus in the inoculums. According to our hypothesis both test showed that the virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 has a higher adsorption rate than P13-SigE7LAMP-TK⁻. This data indicates that IGFBP-3 integrated into IMVs could help virus adsorption by interacting with the ECM, but it has to be assumed that in this case IGFBP-3 should be detected in the viral membrane, which is not the case.

We therefore considered an alternative hypothesis and decided to measure the amount of PS in IMVs of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. It has been observed that VACV enters cells by macropinocytosis. To induce macropinocytosis VACV uses molecular mimicry to resemble apoptotic bodies thanks to PS in the viral membrane (Mercer a Helenius, 2010). It was also observed that different strains of VACVs induce different types of macropinocytosis. To measure the amount of PS we used flow virometric methods that bind virus particles to nano- or micro- particles, stain them with fluorescent antibodies and measure the fluorescence using flow cytometers. In our case we modified an assay devised to detect and quantify HIV by binding to microbeads covered with anti-GP120 antibodies and staining with fluorescent nanoparticles. In our assay we immobilized purified rVACV IMVs using microbeads covered with protein G and coated with anti-VACV antibodies. This approach is advantageous as it allows identification of microbeads with conjugated VACV by light scatter parameters FSC and SSC. Although VACV is a large DNA virus, its size of approx. 300 nm places it close to the detection limits of light scatter of common flow cytometers such as BD LSRFortessa (Headland et al., 2014). To measure the amount of PS we used PE stained Annexin V. We observed that the virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 contains more PS in its membrane than P13-SigE7LAMP-TK⁻. Therefore we assume that high levels of pro-apoptotic IGFBP-3 during IMV morphogenesis leads to formation of virions with elevated PS content. These virions are more efficiently macropinocytosed which leads to improved efficacy of cell infection and higher replication. This could lead to longer persistence of the P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 virus *in vivo*, which in turn would lead to a prolonged stimulation of the anti-tumor immune response and reduced growth of tumors.

Immunization against M2 polarized TAM

Before testing a DNA vaccine against legumain it was necessary to characterize if our MK16/ABC cell induced tumor model contains infiltration of TAMs expressing legumain. Firstly, we used immunohistochemistry to show that tumors contain macrophages and cells expressing legumain, but histology could not determine if the legumain expressing cells are macrophages. We therefore decided to use flow cytometry to analyze expression of legumain in TAM. Originally, we defined TAM based on the expression of the markers F4/80 and MHC II, but we observed that this staining method could not identify TAMs, although it is suitable to detect peritoneal macrophages. This could be due to lower expression of MHC II on M2 polarized TAMs (Wang et al., 2011). Therefore we decided to define TAMs based on expression of CD11b and F4/80. Using this combination of markers

we were able to define TAMs and found out that 48% of TAMs in MK16/ABC tumors expressed legumain.

In the next step we constructed a DNA vaccine against legumain. We decided to modify the gene sequence of legumain to increase its immunogenicity. Firstly, we used mutagenesis to change the amino acid sequence of the RGD motif. In previous work it was shown that mutation of RGD in PC-1 led to altered subcellular localization and decreased stability (Lusson et al., 1997). We assumed that changes in localization and decreased stability could lead to enhanced production of antigenic peptides. In agreement with this hypothesis we observed impaired maturation and changed cellular localization, which was associated with three times higher immunogenicity of the mutated legumain protein when compared to wt legumain. A similar increase of immunogenicity was observed in the case of our second modification, which was based on insertion of the p30 helper epitope derived from tetanus toxin that is capable of binding to MHC II and stimulating CD4⁺ T-lymphocytes. No further increase in immunogenicity was observed when both of the modifications were combined together. We suppose that this is due to comparable effects of the p30 epitope and RGD mutation on legumain stability and localization.

DNA vaccination using gene gun leads to induction of T_H1 as well as T_H2 immune responses (Dean et al., 2003). We also observed that T_H1 and T_H2 cells responded to the p30 epitope used in our DNA vaccine against legumain. Cytokines produced by T_H2 lymphocytes support antibody dependent responses and can lead to differentiation of suppressive M2 macrophages (Baay et al., 2011). On the other hand T_H1 lymphocytes are an important part of anti-tumor immunity. In the process of licensing they activate DC to become more potent stimulators of CD8⁺ CTL. Furthermore T_H1 cells support infiltration of CTLs into tumors and protect them from exhaustion (Bos and Sherman, 2010; Aubert et al., 2011).

To increase the T_H1 response we decided to combine gene gun immunization with IP administration of CpG-ODN, which acts as an adjuvant for T_H1 lymphocytes. Results previously published by our laboratory have shown that systemic administration CpG can increase the anti-tumor effect of DNA immunization by gene gun (Smahel et al., 2011). From a molecular perspective, unmethylated CpG sequences mimic bacterial DNA which represents a PAMP. This DNA is recognized by TLR-9 expressed by pDCs and through activation of IRF7 leads to induction of IFN I production (Kumagai et al., 2008). We were unable to show that CpG administration would lead to increase in T_H1 responses or enhance the induction of CD8⁺ CTLs.

Induction of immune responses against auto-antigens can be impaired by Treg and it was described that depletion of Tregs by an anti-CD25 antibody could enhance the activity of CD8⁺ CTLs (Chuang et al., 2009). In agreement with this observation depletion of Tregs before immunization significantly enhanced the immune response against legumain by vaccination with LgmnRGG.TT11.

Next, we investigated if immunization with LgmnRGG.TT11 alone or in combination with Treg depletion could inhibit tumor growth. We observed that the immunization against legumain

significantly impaired tumor growth as efficiently as Treg depletion alone. Combination of the two approaches did not enhance the anti-tumor effect. Contrary the group of mice with depleted Tregs and immunized with LgmnRGG.TT11 had slightly greater tumors compared to mice immunized with LgmnRGG.TT11 alone. Although CD25 is constitutively expressed on Tregs, it can be induced on activated effector T-cells (Seddiki et al., 2006). Administration of anti-CD25 can therefore eliminate early activated effector T-cells.

As LgmnRGG.TT11 can inhibit tumor growth we wanted to elucidate if a reduction of legumain⁺ TAMs can be observed. We were unable to show that immunization against legumain reduced the amount of legumain⁺ TAMs. It has been reported that TAMs preferentially infiltrate in hypoxic areas (Chanmee et al., 2014). It is therefore possible that in tumors that reached a size of 1 cm in the longest axis, and were used for flow cytometric analysis, TAMs reside in hypoxic areas. Furthermore hypoxic conditions lead to increase in legumain expression (Chen et al., 2015). On the other hand T-lymphocytes react to hypoxia by inducing expression of HIF-1 α , which negatively regulates signal transduction from TCR and decreases the expression of inflammatory cytokines (Kumar and Gabrilovich, 2014). Hypoxia also enhances expression of co-inhibitory molecules e.g. PD-1L on TAM, which could lead to inhibition of CD8⁺ CTLs (Noman et al., 2014). We hypothesize that elimination of legumain⁺ TAMs by CD8⁺ CTLs occurs in the early stage of tumor development in which TAMs are more accessible for CD8⁺ CTLs and that this leads to further decrease in tumor growth. It cannot be ruled out that legumain expression occurs in other cells in the tumor such as in the MK16/ABC cell them self, but western-blot analysis was unable to detect any legumain expression in MK16/ABC cells. Expression of legumain could be potentially induced *in vivo* by hypoxia, but this was not observed by histology.

We were also unable to show that immunization against legumain decreases the formation of lung metastases. It has been shown that development of lung metastasis by MK16/ABC cells correlates with the development of the primary tumor (Mikyskova et al., 2000). We have therefore analyzed tumors that reached a size of 1 cm³. It is possible the immune system of mice with tumors of this size is already exhausted and that it can no longer control the spread of tumor cells.

5. Conclusions

We tested two strategies for tumor microenvironment modulation. The first was based on rVACV co-expressing the tumor suppressor gene IGFBP-3 and the immunogen SigE7LAMP. We have shown that the highest levels of IGFBP-3 protein were produced when gene expression was controlled by the early H5 promoter. Furthermore we observed that high level expression of IGFBP-3 correlated with inhibition of tumor growth in mice immunized with P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3. On the other hand expression of IGFBP-3 alone had no effect on tumor growth. During the characterization of the observed inhibitory effect we found out that the virus P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 replicates significantly better than the control virus P13-SigE7LAMP-TK⁻ and that this is associated with high levels of IGFBP-3 expression. Structural analysis of rVACV revealed several differences between P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 and P13-SigE7LAMP-TK⁻. Firstly, high level expression of IGFBP-3 leads to its incorporation into IMVs of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 and is associated with better virus adsorption onto cells. Secondly, using flow cytometry, we observed that high levels of pro-apoptotic IGFBP-3 lead to generation of P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 IMVs with elevated PS content. Based on these results we hypothesize that high level expression of IGFBP-3 leads to its incorporation into IMVs and increases their PS content. These IMVs can subsequently infect cell more effectively due to improved ability to induce macropinocytosis. A more effective infection leads to prolonged persistence of the rVACV in a host and consequently to a more effective stimulation of the immune response that in turn results into inhibition of tumor growth. Our observations suggest that it is feasible to change the PS content of VACV IMVs and thereby modulate virus replication.

The second strategy was based on the development of a DNA vaccine against M2 polarized TAM expressing the endopeptidase legumain. In the first phase it was necessary to characterize if the cervical carcinoma model based on MK16/ABC cells contains infiltration of legumain⁺ TAMs. Using immunohistochemistry and flow cytometry we confirmed that tumor induced by MK16/ABC cells indeed contain TAM of which 48% express legumain. In the next step, we constructed a DNA vaccine and its variants, where we modified the legumain gene by mutating its RGD motif and/or by inserting the p30 helper epitope to enhance its immunogenicity. We observed that both of these modifications affect legumain maturation and change its cellular location, which associates with increased immunogenicity of these constructs. Combination of RGD mutation and insertion of the p30 epitope did not lead to further increase in the immune response against legumain. As DNA immunization by gene gun induces also a T_H2 response, we decided to strengthen the induction of T_H1 and CD8⁺ CTL by administration of CpG-ODN or by depleting Tregs. The administration of CpG did not increase the induction of CD8⁺ CTL responses. On the other hand depletion of Tregs significantly improved the immune response induced by LgmnRGG.TT11. Furthermore the immunization with LgmnRGG.TT11 inhibited tumor growth as efficiently as Treg depletion alone. Combination of LgmnRGG.TT11 immunization and Treg depletion did not enhance the anti-tumor effect. We also monitored if

immunization with LgmnRGG.TT11 leads to decrease in numbers of legumain⁺ TAMs and inhibition of lung metastases formation. We were unable to show, that immunization with LgmnRGG.TT11 decreases the amount of legumain⁺ TAMs or can inhibit formation of lung metastasis. We hypothesize that immunization against legumain inhibits tumor in early stages of their development. In larger tumors the immune system fails to control tumor cell spread and is unable to prevent formation of lung metastasis. Legumain⁺ TAMs on the other hand can accumulate in hypoxic areas of larger tumors where they are protected from CD8⁺ CTL mediated cytotoxicity.

6. Životopis (Curriculum vitae)

Name: Mgr. Jan Musil

Birth date: 5.4.1986

Work address: Department of Immunology
Institute of Hematology and Blood Transfusion
U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic

E-mail: musil@uhkt.cz

Education:

2005-2008 Faculty of Sciences, Charles University in Prague,
Bachelor's study programme: Biology

2008-2010 Faculty of Sciences, Charles University in Prague,
Master's study programme: Genetics, Molecular Biology and Virology
specialization: Virology

2010-2015 Faculty of Sciences, Charles University in Prague,
Doctoral study programme: Molecular and Cellular Biology, Genetics
and Virology
specialization: Virology

Working experience

2009- Institute of Hematology and Blood Transfusion,
Department of Immunology

7. Vlastní publikace (Bibliography)

Publikace, které jsou podkladem disertační práce

(List of publications involved in the PhD. Thesis)

1. **Musil J.**, Kutinova L, Zurkova K, Hainz P, Babiarova K, Krystofova J, Nemeckova S. Antitumor activity and immunogenicity of recombinant vaccinia virus expressing HPV 16 E7 protein SigE7LAMP is enhanced by high-level coexpression of IGFBP-3. Cancer Gene Ther. 2014 Mar;21(3):115-25. doi: 10.1038/cgt.2014.6. Epub 2014 Feb 21.
2. Smahel M, Duskova M, Polakova I, **Musil J.** Enhancement of DNA vaccine potency against legumain. J Immunother. 2014 Jun;37(5):293-303. doi:10.1097/CJI.0000000000000040. PubMed PMID: 24810641.

Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce

(List of publications not related to the PhD. Thesis)

1. Babiarova K, Kutinova L, Zurkova K, Krystofova J, Brabcova E, Hainz P, **Musil J.**, Nemeckova S. Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice. J Immunother. 2012 Jul;35(6):478-87. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182618381. PubMed PMID: 22735806.

Plakátová sdělení (Poster presentations)

1. ŠROLLER V., SALÁKOVÁ M., LUDVÍKOVÁ V., HAMŠÍKOVÁ E., VOCHOZKOVÁ P., **MUSIL J.**, NĚMEČKOVÁ Š. The prevalence of novel polyomaviruses in healthy and immunocompromised individuals. DNA Tumour Virus Meeting, 22-27.7.2013, Birmingham UK.
2. **Musil J.**, Kutinova L, Zurkova K, Hainz P, Babiarova K, Krystofova J, Nemeckova S. High-level expression of IGFBP-3 by the recombinant vaccinia virus leads to its incorporation into the intracellular mature virions and enhances virus replication and immunogenicity. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, 22-27. August 2013
3. Smahel M, Duskova M, Polakova I, **Musil J.**, Petrackova M. Immunization against tumor-associated macrophages - enhancement of DNA vaccine potency against legumain. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, 22-27. August 2013

4. ŠROLLER V., SALÁKOVÁ M., LUDVÍKOVÁ V., MUSIL J., HAMŠÍKOVÁ E., STAŠÍKOVÁ J., NĚMEČKOVÁ Š. The prevalence of novel polyomaviruses in the Czech Republic. Hradecké virologické dny 2013, 15-17.října 2013, Hradec Králové, ČR
5. Musil J., Kutinova L, Zurkova K, Hainz P, Babiarova K, Krystofova J, Nemeckova S. Antitumor activity and immunogenicity of recombinant vaccinia virus expressing HPV16 E7 protein SigE7LAMP is enhanced by high-level co-expression of IGFBP-3. CIMT Annual Meeting 2014, Mainz, Germany, 6-8. May 2014
6. ŠROLLER V., SALÁKOVÁ M., LUDVÍKOVÁ V., HAMŠÍKOVÁ E., MUSIL J., HAINZ P., NĚMEČKOVÁ Š. The detection of novel polyomaviruses in human tissues. Molecular Biology of DNA Tumor Virus Conference, 21-25.7.2014, Madison, WI, USA
7. Babiarová K, Kryštofová J, Hainz P, Šťastná M, Musil J., Šroller V, Němečková Š. Detection of anti-HCMV T cell response of potential recipients and donors in cellular immunotherapy of leukemic patients after transplantation of hematopoietic stem cells. 17th Annual Meeting of ESCV, Prague, Czech Republic, 28.9.-1.10. 2014

8. Vlastní podíl

Projekt rVACV exprimujících IGFBP-3

- konstrukce rekombinačního plazmidu
- příprava a purifikace některých jednoduchých rVACV
- identifikace rVACV pomocí PCR
- charakterizace exprese IGFBP-3 rVACV
- stanovení obsahu proteinu v suspenzích IMV, jejich frakcionace a analýza pomocí western-blotu
- analýza obsahu PS pomocí průtokové cytometrie

Projekt DNA vakcíny proti legumainu

- zavedení metodiky přípravy jednobuněčné suspenze z nádorů
- navrhnutí a testování panelu protilátek pro detekci legumain⁺ TAM
- analýza infiltrace legumain⁺ TAM v nádorech
- hodnocení plicních metastáz

9. Seznam citované literatury (References)

- Adair-Kirk, T. L. and R. M. Senior. 2008. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 40:1101-1110. doi:S1357-2725(07)00409-8 [pii];10.1016/j.biocel.2007.12.005 [doi].
- Aubert, R. D., A. O. Kamphorst, S. Sarkar, V. Vezys, S. J. Ha, D. L. Barber, L. Ye, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2011. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 108:21182-21187. doi:1118450109 [pii];10.1073/pnas.1118450109 [doi].
- Baay, M., A. Brouwer, P. Pauwels, M. Peeters, and F. Lardon. 2011. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin.Dev.Immunol.* 2011:565187. doi:10.1155/2011/565187 [doi].
- Bos, R. and L. A. Sherman. 2010. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res.* 70:8368-8377. doi:0008-5472.CAN-10-1322 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-1322 [doi].
- Braumuller, H., T. Wieder, E. Brenner, S. Assmann, M. Hahn, M. Alkhaled, K. Schilbach, F. Essmann, M. Kneilling, C. Griessinger, F. Ranta, S. Ullrich, R. Mocikat, K. Braungart, T. Mehra, B. Fehrenbacher, J. Berdel, H. Niessner, F. Meier, M. van den Broek, H. U. Haring, R. Handgretinger, L. Quintanilla-Martinez, F. Fend, M. Pesic, J. Bauer, L. Zender, M. Schaller, K. Schulze-Osthoff, and M. Rocken. 2013. T-helper-cell cytokines drive cancer into senescence-1. *Nature* 494:361-365. doi:nature11824 [pii];10.1038/nature11824 [doi].
- Chanmee, T., P. Ontong, K. Konno, and N. Itano. 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers.(Basel)* 6:1670-1690. doi:cancers6031670 [pii];10.3390/cancers6031670 [doi].
- Chen, H., X. Liu, E. S. Clayman, F. Shao, M. Xiao, X. Tian, W. Fu, C. Zhang, B. Ruan, P. Zhou, Z. Liu, Y. Wang, and W. Rui. 2015. Synthesis and Evaluation of a CBZ-AAN-Dox Prodrug and its in vitro Effects on SiHa Cervical Cancer Cells Under Hypoxic Conditions. *Chem.Biol.Drug Des.* doi:10.1111/cbdd.12525 [doi].
- Chuang, C. M., T. Hoory, A. Monie, A. Wu, M. C. Wang, and C. F. Hung. 2009. Enhancing therapeutic HPV DNA vaccine potency through depletion of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Vaccine* 27:684-689. doi:S0264-410X(08)01574-0 [pii];10.1016/j.vaccine.2008.11.042 [doi].
- Cirri, P. and P. Chiarugi. 2012. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31:195-208. doi:10.1007/s10555-011-9340-x [doi].
- Dean, H. J., D. Fuller, and J. E. Osorio. 2003. Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 26:373-388. doi:S0147-9571(03)00021-3 [pii];10.1016/S0147-9571(03)00021-3 [doi].
- Eyles, J., A. L. Puaux, X. Wang, B. Toh, C. Prakash, M. Hong, T. G. Tan, L. Zheng, L. C. Ong, Y. Jin, M. Kato, A. Prevost-Blondel, P. Chow, H. Yang, and J. P. Abastado. 2010. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J.Clin.Invest* 120:2030-2039. doi:42002 [pii];10.1172/JCI42002 [doi].
- Goda, N., T. Tenno, K. Inomata, M. Shirakawa, T. Tanaka, and H. Hiroaki. 2008. Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5. *Exp.Cell Res.* 314:2352-2361. doi:S0014-4827(08)00210-3 [pii];10.1016/j.yexcr.2008.05.008 [doi].
- Gomez, C. E. and M. Esteban. 2001. Recombinant proteins produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV form) into different compartments. *Arch.Virol.* 146:875-892.
- Harper, J. and R. C. Sainson. 2014. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin.Cancer Biol.* 25:69-77. doi:S1044-579X(14)00002-9 [pii];10.1016/j.semcancer.2013.12.005 [doi].
- Headland, S. E., H. R. Jones, A. S. D'Sa, M. Perretti, and L. V. Norling. 2014. Cutting-edge analysis of extracellular microparticles using ImageStream(X) imaging flow cytometry. *Sci.Rep.* 4:5237. doi:srep05237 [pii];10.1038/srep05237 [doi].
- Hynes, R. O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-1219. doi:326/5957/1216 [pii];10.1126/science.1176009 [doi].
- Ingermann, A. R., Y. F. Yang, J. Han, A. Mikami, A. E. Garza, L. Mohanraj, L. Fan, M. Idowu, J. L. Ware, H. S. Kim, D. Y. Lee, and Y. Oh. 2010. Identification of a novel cell death receptor mediating IGFBP-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *J.Biol.Chem.* 285:30233-30246. doi:M110.122226 [pii];10.1074/jbc.M110.122226 [doi].
- Kim, B. C., M. K. Ju, A. Dan-Chin-Yu, and P. Sommer. 2009. Quantitative detection of HIV-1 particles using HIV-1 neutralizing antibody-conjugated beads. *Anal.Chem.* 81:2388-2393. doi:10.1021/ac802267u [doi];10.1021/ac802267u [pii].
- Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira. 2008. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 60:795-804. doi:S0169-409X(07)00382-1 [pii];10.1016/j.addr.2007.12.004 [doi].
- Kumar, V. and D. I. Gabrilovich. 2014. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology* 143:512-519. doi:10.1111/imm.12380 [doi].
- Liskova, J., J. Knitlova, R. Honner, and Z. Melkova. 2011. Apoptosis and necrosis in vaccinia virus-infected HeLa G and BSC-40 cells. *Virus Res.* 160:40-50. doi:S0168-1702(11)00172-9 [pii];10.1016/j.virusres.2011.05.005 [doi].
- Liu, V. C., L. Y. Wong, T. Jang, A. H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B. A. Teicher, and C. Lee. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+. *J.Immunol.* 178:2883-2892. doi:178/5/2883 [pii].
- Lusson, J., S. Benjannet, J. Hamelin, D. Savaria, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1997. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem.J.* 326 (Pt 3):737-744.

- Mercer, J. and A. Helenius. 2010. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1209:49-55. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05772.x [doi].
- Mikyskova, R., J. Bubenik, L. Mendoza, V. Vonka, M. Smahel, J. Simova, and T. Jandlova. 2000. Local cytokine treatment of HPV16-associated tumours results in inhibition of their lung metastases. *Clin.Exp.Metastasis* 18:581-587.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochoy, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 30:899-911. doi:S1074-7613(09)00202-7 [pii];10.1016/j.immuni.2009.03.019 [doi].
- Nakamura, K., A. Hongo, J. Kodama, Y. Miyagi, M. Yoshinouchi, and T. Kudo. 2000. Down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor by antisense RNA can reverse the transformed phenotype of human cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 60:760-765.
- Nemeckova, S., V. Sroller, P. Hainz, J. Krystofova, M. Smahel, and L. Kutinova. 2003. Experimental therapy of HPV16 induced tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. *Int.J.Mol.Med.* 12:789-796.
- Noman, M. Z., G. Desantis, B. Janji, M. Hasmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte, and S. Chouaib. 2014. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J.Exp.Med.* 211:781-790. doi:jem.20131916 [pii];10.1084/jem.20131916 [doi].
- Perkus, M. E., D. Panicali, S. Mercer, and E. Paoletti. 1986. Insertion and deletion mutants of vaccinia virus. *Virology* 152:285-297.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-1570. doi:331/6024/1565 [pii];10.1126/science.1203486 [doi].
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and G. B. Fazekas de St. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J.Exp.Med.* 203:1693-1700. doi:jem.20060468 [pii];10.1084/jem.20060468 [doi].
- Smahel, M., I. Polakova, E. Sobotkova, and E. Vajdova. 2011. Systemic administration of CpG oligodeoxynucleotide and levamisole as adjuvants for gene-gun-delivered antitumor DNA vaccines. *Clin.Dev.Immunol.* 2011:176759. doi:10.1155/2011/176759 [doi].
- Tugal, D., X. Liao, and M. K. Jain. 2013. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 33:1135-1144. doi:ATVBAHA.113.301453 [pii];10.1161/ATVBAHA.113.301453 [doi].
- Wang, B., Q. Li, L. Qin, S. Zhao, J. Wang, and X. Chen. 2011. Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II(hi) to MHC class II(low) mediates tumor progression in mice. *BMC.Immunol.* 12:43. doi:1471-2172-12-43 [pii];10.1186/1471-2172-12-43 [doi].
- Wyckoff, J. B., Y. Wang, E. Y. Lin, J. F. Li, S. Goswami, E. R. Stanley, J. E. Segall, J. W. Pollard, and J. Condeelis. 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67:2649-2656. doi:67/6/2649 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-1823 [doi].
- Yamada, P. M. and K. W. Lee. 2009. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 296:C954-C976. doi:00598.2008 [pii];10.1152/ajpcell.00598.2008 [doi].
- Zurkova, K., P. Chlanda, Z. Samkova, K. Babiarova, L. Kutinova, J. Krystofova, P. Hainz, and S. Nemeckova. 2011. Expression of soluble TGF-beta receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. *Neoplasma* 58:181-188.
- Zurkova, K., P. Hainz, J. Krystofova, L. Kutinova, M. Sanda, and S. Nemeckova. 2010. Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand. *Virology* 7:109. doi:1743-422X-7-109 [pii];10.1186/1743-422X-7-109 [doi].

